

适于 AFLP 分析的酵母菌 DNA 提取方法

刘云鹏 倪慧娟 孙天松 于洁 张和平*

(内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要: 采用 3 种方法对不同酵母菌的总 DNA 进行提取, 经琼脂糖凝胶电泳、ND-1000 型微量紫外分光光度计检测以及酶切、连接、预扩增试验结果的分析, 表明采用改良氯化苄法提取酵母菌的总 DNA 质量最好, 基本无 DNA 碎带, 蛋白质污染小。通过对野生酵母菌菌株的验证试验, 进一步证明采用改良氯化苄法提取的总 DNA 产量稳定、重复性好, 可以直接用于限制性内切酶酶切试验, 完全适于 AFLP 分析及一些其它分子生物学研究的要求。

关键词: 酵母菌, DNA 提取, 氯化苄, AFLP 分析

Method of Extract Genomic DNA of Yeast for AFLP

LIU Yun-Peng NI Hui-Juan SUN Tian-Song YU Jie ZHANG He-Ping*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education,
Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018)

Abstract: The high molecular weight genomic DNA of yeast was extracted using three methods. Products were separated on agarose gel electrophoresis, quantified by spectrophotometer ND-1000 and restricted by *EcoR* and *Mes*. The result was shown that the genomic DNA extracted by modified benzyl chloride method was the best. The products of wild isolates supported it, too. This method was suitable for restriction of genomic DNA from yeast.

Keywords: Yeast, DNA extract, Benzyl chloride, AFLP analysis

我国酵母菌资源丰富, 种类繁多, 分类主要依靠传统方法。随着现代分子生物学的快速发展, 一些分子标记法在国内已经逐渐应用于酵母菌分类和遗传多样性研究领域^[1-3], 促进了酵母菌分子分类系统的建立与发展。

扩增片段长度多态性(AFLP)是一种新的 DNA 分子标记技术, 具有高效、快捷、稳定、可靠的特点^[4]。获得一定浓度和高纯度的完整 DNA 是进行 AFLP 研究的基础。

酵母菌细胞壁中含有丰富的几丁质^[5], 国内外

已有多种酵母菌总 DNA 制备方法的报道, 但它们都存在各自的优缺点^[6-8]。本研究是从 3 种针对酵母菌细胞壁提取总 DNA 的方法中选取一种有效的方法, 来提取高质量的总 DNA, 为后续 AFLP 分子标记实验及其他的分子生物学研究做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: 参考菌株 *Candida kefyr* AS 2.68、*Kluyveromyces lactis* var. *lactis* AS 2.1494、*Kluyvero-*

myces marxianus AS 2.1549 购自中科院微生物研究所; *Saccharomyces cerevisiae* CICC 1621 购自内蒙古轻工研究所; 野生菌株 XJ1、XJ2、XJ3 分离自新疆维吾尔自治区的酸马奶, QH1、QH1、QH3 分离自青海省的酸牦牛奶、山羊奶, YN1、YN2 分离自云南的乳扇、乳饼, MG1、MG2 分离自蒙古国的酸马奶, 以上菌株均由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供。

1.1.2 试剂和仪器: 氯化苄(分子式 PbCH_3Cl)为北京化学试剂厂产分析纯原液, 内切酶 *Mse* 和 *EcoR* 购自上海生物工程有限公司, T4 Ligase、Taq DNA 聚合酶和 Marker λ -*Hind* 以及 DL2000 购自宝生物工程有限公司, 接头购自上海桑尼生物科技有限公司, 引物由北京赛百盛公司合成; 梯度基因扩增仪 PTC-200 购自美国 MJ 公司, 凝胶成像分析系统 CDS8000 购自美国 UVP 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种的培养: 将活化酵母菌接种于 30 mL YPD(Yeast extract Potato Dextrose)液体培养基, 25 摇床培养至对数生长期后混匀分成 3 份, 3000 r/min 离心 5 min 收集菌体。最后收集菌泥约 0.5 g, 用 1 mL 生理盐水洗 2 次, 放于 -20 备用。

1.2.2 DNA 的提取: 氯化苄法提取酵母菌 DNA 参照朱衡等方法^[9]; 玻璃珠法提取酵母菌 DNA 参照精编分子生物学实验方法^[10]; SDS 法提取酵母菌总 DNA 参照分子克隆实验指南方法^[11], 并根据实际

情况做适当修改。

1.3 DNA 的质量检测

1.3.1 DNA 的定量和纯度检测: 利用 ND-1000 型微量紫外分光光度计测定以上 3 种方法提取的 DNA 的含量及其 OD_{260}/OD_{280} 的比值。将 3 种方法提取的总 DNA 稀释至 100 ng/ μL , 取 2 μL 在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性, 电泳条件为 3 V/cm, 1.5 h。

1.3.2 稳定性和实用性的验证: 利用氯化苄法提取传统发酵乳制品中分离的野生酵母菌 DNA, 在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取结果。

1.4 DNA 适于 AFLP 的检测

1.4.1 酶切试验: 采用 20 μL 酶切体系, 5 μL 基因组(100 ng/ μL), 37 水浴 3 h, 65 水浴 30 min。

1.4.2 连接试验: 采用 20 μL 连接体系, 加入 10 μL 酶切产物, 37 水浴过夜。

1.4.3 预扩增试验: 采用 20 μL 扩增体系, 加入稀释连接产物 5 μL , 引物为不带选择性碱基的基础引物。

2 结果与分析

2.1 DNA 的得率和纯度

3 种方法提取 DNA 的得率如表 1 所示。用氯化苄法从每克酵母菌中提取到的 DNA 量最多, 平均在 164 $\mu\text{g/g}$, 得率是另外两种方法的十几倍以上, 而玻璃珠法、SDS 法得率比较少。

表 1 3 种方法提取酵母菌总 DNA 的得率
Table 1 Yield of three Method of Extract genomic DNA of yeast

菌种名称 Strain name	酵母菌 DNA 得率($\mu\text{g/g}$ 菌体) Yield of yeast DNA($\mu\text{g/g}$ Thallus)		
	氯化苄法 Benzyl chloride method	玻璃珠法 Glass pearls method	SDS 法 SDS method
AS2.68(<i>C. kefyr</i>)	137.5	18.6	33.6
AS2.1494(<i>K. lactis</i>)	175.4	24.5	74.6
AS2.1549(<i>K. marxianus</i>)	157.7	22.0	86.3
CICC1621(<i>S. cerevisiae</i>)	185.5	32.9	84.4
平均值	164.0	24.5	69.7

DNA 的纯度主要看蛋白质、糖、RNA 及其他杂质污染的程度, 可通过 OD_{260}/OD_{280} 比值和感官来评定^[12]。通常 OD_{260}/OD_{280} 比值越接近 1.8, 表明 DNA 越纯; 在 1.8~2.0 之间表明有 RNA 污染; 大于 2.0 表明 DNA 有降解或 RNA 比较多; 小于 1.8 有蛋白质污染。通过 DNA 沉淀物形状和干燥后

的颜色, 可以从感官上评定糖、酚等一些杂质的污染程度。含糖比较多的 DNA 沉淀时, 沉淀物常常呈胶冻状, 纯 DNA 则为絮状沉淀; 含有酚类杂质的 DNA 沉淀物多呈黄色至深褐色, 难以溶解或溶液颜色深^[13, 14]; 纯 DNA 为白色类似石棉样的纤维状物。3 种方法的 OD_{260}/OD_{280} 比值及状态见表 2。

表 2 3 种方法提取酵母菌总 DNA 的纯度与浓度
Table 2 Purity and concentration three Methods of extract genomic DNA of yeast

方法 Method	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ 比值(A ₂₆₀ /A ₂₈₀ of ratios)				平均值	DNA 的颜色	DNA 沉淀形状
	AS2.68 (<i>C.kefyr</i>)	AS2.1494 (<i>K.lactis</i>)	AS2.1549 (<i>K.marxianus</i>)	CICC1621 (<i>S.cerevisiae</i>)			
氯化苄法(Benzylchloride method)	1.86	1.85	1.76	1.82	1.82	白色透明	絮状
玻璃珠法(Glass pearls method)	1.46	1.67	1.76	1.63	1.63	白色粉末	胶冻状
SDS 法(SDS method)	2.20	1.99	2.21	2.09	2.12	黄褐色半透明	半絮状

2.2 DNA 的完整性和高质量性

电泳条带的亮度和整洁能直观评定 DNA 的完整性和高质量性。图 1 为 3 种方法提取参考菌株 DNA 的电泳结果。3 种方法均能从酵母菌中提取到总 DNA, 片段大小均在 23 kb。氯化苄法提取的总 DNA 最完整、纯度最高、质量最好; 玻璃珠法次之; SDS 法拖带, 有降解。

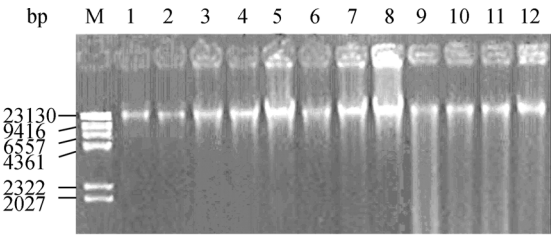


图 1 3 种方法提取总 DNA 的电泳图

Fig. 1 The results of three methods of extract genomic DNA of yeast
M: λ -Hind marker; 1-4: 氯化苄法; 5-8: 玻璃珠法; 9-12: SDS 法
M: λ -Hind marker; 1-4: Benzyl chloride method; 5-8: Glass pearls method; 9-12: SDS method

2.3 氯化苄法提取 DNA 的稳定性和实用性

使用野生酵母菌提取 DNA 可以验证氯化苄法的稳定性和实用性, 电泳结果如图 2。由图可以看出氯化苄法提取野生酵母菌的总 DNA 完整性好、无降解、纯度高、重复性好。

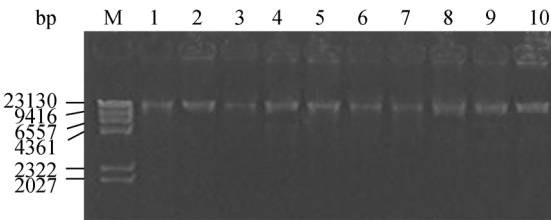


图 2 氯化苄法提取野生酵母菌总 DNA 的电泳图

Fig. 2 The results of genomic DNA of wild yeast use benzyl chloride method
M: λ -Hind marker; 1-3: XJ1, 2, 3; 4-6: QH1, 2, 3; 7, 8: MG1, 2; 9, 10: YN1, 2

2.4 DNA 适于 AFLP 的检测结果

从图 3 可以看出, 氯化苄法提取的总 DNA 酶切条带最亮, 玻璃珠法次之, SDS 法最差。由于

AFLP 酶切的模板被定量, 所以说明氯化苄法提取的总 DNA 纯度最高、质量最好。玻璃珠法和 SDS 法提取的总 DNA 纯度不高, 可能含有内切酶 *Mse* 和 *EcoR* 的抑制剂, 导致酶切不充分。氯化苄法提取的 DNA 被均匀切成 100 bp ~1000 bp 片段, 呈 smear 状。玻璃珠法、SDS 法所提取的 DNA 酶切不够均匀, 片段偏大, 多在 200 bp ~1500 bp。

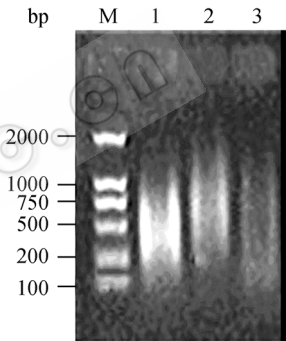


图 3 AFLP 的酶切电泳图

Fig. 3 The results of digestion of AFLP
M: DL2000 分子标记; 1: 氯化苄法; 2: 玻璃珠法; 3: SDS 法
M: DL2000 Marker; 1: Benzyl chloride method; 2: Glass pearls method; 3: SDS method

图 4 为 AFLP 的预扩增结果, 从图中可以看出氯化苄法提取的总 DNA 扩增范围较宽(100 bp~

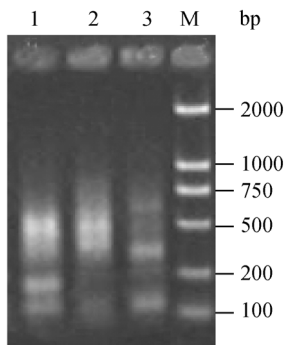


图 4 AFLP 的预扩增电泳图

Fig. 4 The results of pre-PCR of AFLP
M: DL2000 分子标记; 1: 氯化苄法; 2: 玻璃珠法; 3: SDS 法
M: DL2000 Marker; 1: Benzyl chloride method; 2: Glass pearls method; 3: SDS method

1000 bp)、扩增量较大;玻璃珠法提取的总 DNA 扩增范围较大,但是扩增量较小;SDS 法提取的总 DNA 扩增量较小。

3 结论

从酵母菌中提取到高质量的 DNA,使其能被内切酶完全酶切,是成功进行各种分子实验分析的前提^[14]。就 AFLP 的技术操作而言,酶切和扩增这两步是非常重要的^[15]。

本研究得出以下几点结论:

(1) 通过比较 3 种提取酵母菌总 DNA 的方法,得出氯化苄法更适合提取酵母菌基因组 DNA。

(2) 通过对不同地区传统工艺酿造的乳制品中分离出的野生菌基因组 DNA 的提取,进一步证明氯化苄法的稳定性和实用性。

(3) 通过对 3 种方法提取的酵母菌基因组 DNA 酶切、连接与预扩增验证实验,氯化苄法提取的酵母菌基因组 DNA 更适合做进一步的 AFLP 分析实验。

(4) 氯化苄是一种普通有机试剂,价格比较便宜。氯化苄提取酵母菌基因组 DNA 的方法简便又快捷。但是氯化苄有腐蚀性,实验操作时应小心。

(5) 在 pH 值为 9.0 条件,氯化苄与酵母菌细胞壁中的几丁质充分反应^[12],细胞壁破碎完全。在实验中发现,含有 1% SDS 裂解液对蛋白去除不好,因此,对氯化苄法作了改进,提高裂解液 SDS 的浓度至 2%。

简便高效的氯化苄提取酵母菌的基因组 DNA 方法,在进一步酵母菌鉴定、生物进化、系统发育、多态性以及构建指纹图谱的研究中将发挥重要作用。

参 考 文 献

[1] 沈力飞,杨振泉.不同来源酿酒酵母菌株的随机扩增多

态 DNA 分析.食品与发酵工业,2005,31(10):1-4.

[2] 徐 勇,张 博.利用 RAPD 分子标记研究酵母菌的亲缘关系.林产化学与工业,2005,25(1):1-4.

[3] 杨继勇,周贵民,谢 灵.随机扩增多态性 DNA 鉴定酵母菌的初步探讨.进修学院学报,2000,21(1):73-76.

[4] P Vos R Hogers, M Bleeker, M Zabeau, *et al*. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *NAR*, 1995, 23(21): 4407-4414.

[5] 周德庆.微生物学教程.北京:高等教育出版社,1991, pp.51-52.

[6] 白彦彦,贾建华.克鲁斯假丝酵母及其近似的脉冲电泳核型分析.微生物学报,1996,36(5):329-334

[7] 秦振宇, Hopf RL. 玻璃珠-盐析法提取常见致病真菌 DNA 的研究.中华皮肤科杂志,2000,33(5):330-332.

[8] 张君艳,袁庆华.苜蓿假盘菌基因组 DNA 提取方法.植物保护,2006,32(6):132-135.

[9] 朱 衡,瞿 峰,朱立煌.利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA.真菌学报,1994,13(1):34-40.

[10] 颜子颖,王海林.精编分子生物学实验.北京:科学出版社,1999, p.523.

[11] J. 萨姆布鲁克.分子克隆实验指南.北京:科学出版社,1996, pp.25-26.

[12] 杨 建,洪 葵.红树林土壤总 DNA 不同提取方法比较研究.生物技术通报 2006 增刊.

[13] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用.北京:化学工业出版社,2005, p.72.

[14] 董明盛,陈晓红.双歧杆菌基因组 DNA 提取及其遗传多态性研究.中国乳品工业,2003,31(2):1-5.

[15] GU Mueller, Wolfenbarger LL. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, 1999, 14(10):389-394.

[16] 骆利敏,李 明,陈 瑶,等. AFLP 法构建布鲁氏菌基因组 DNA 指纹图谱.中国人兽共患病学报,2006,22(1):15-17.